

О МЕТОДАХ ИССЛЕДОВАНИЯ MYXOSPORIDIA
(PROTOZOA, CNIDOSPORIDIA)

З. С. Донец и С. С. Шульман

Адыгейский педагогический институт, Майкоп
и Зоологический институт АН СССР, Ленинград

В статье рассматривается методика исследования миксоспоридий, необходимая для определения их видовой принадлежности.

Миксоспоридии — многочисленная и широко распространенная группа паразитических простейших, встречающаяся преимущественно у костистых рыб. Поскольку многие из них — возбудители серьезных заболеваний, точная диагностика видов имеет большое практическое значение. Между тем определение миксоспоридий и до настоящего времени встречает большие затруднения. Это связано с малыми размерами паразитов и небольшим числом критериев, используемых для определения видов. Вся система миксоспоридий построена на архитектонике спор; для определения более мелких таксонов используются также форма, размеры и некоторые другие детали их строения. Между тем размеры спор могут заметно изменяться под действием фиксаторов и красителей, что создает большие трудности и путаницу при определении видов.

Уже Сепед (Sépede, 1906) обращал внимание на то, что фиксированные и окрашенные споры на мазках и срезах заметно уменьшаются в размерах по сравнению с живыми. Именно поэтому Кудо (Kudo, 1920) предлагал при описании миксоспоридий приводить отдельно размеры живых, фиксированных и окрашенных спор. В 1921 г. он провел более детальное исследование и показал, что длина споры при фиксации и окраске уменьшается на 16%, ширина — на 28—29%, длина полярных капсул — на 17—21%. Уменьшение размеров зависит от характера фиксирующих жидкостей и неодинаково проявляется у различных видов. Все это создает большие затруднения при определении и в ряде случаев приводит к переописанию уже известных видов. Естественно поэтому попытки многих авторов усовершенствовать и унифицировать методику фиксации и обработки спор миксоспоридий.

Ахмеров и Мартынова (1958) предложили помещать споры в 4% формалин под покровное стекло и обмазывать его края асфальтовым лаком. Преимущество этого метода заключается лишь в сравнительной простоте изготовления препаратов, а также в том, что при помещении спор в формалин хорошо выявляется шовная линия и скульптура створок, имеющие систематическое значение. Однако приготовленные таким методом препараты очень недолговечны. Асфальтовый лак часто растрескивается, что приводит к быстрому высыханию препарата, или, растворяясь в формалине, подтекает под покровное стекло, после чего препарат становится вообще непригодным для исследования. Эта методика не гарантирует уменьшения размера спор и может быть использована только в качестве дополнительного, а не основного метода исследования миксоспоридий и лишь в случаях, когда необходимо рассмотреть слабо заметные скульптуры створок и шовную линию между ними.

Лом (Lom, 1969) предложил метод стандартной микрофотографии свежих спор на агар-агаре. Капля (величиной с булавочную головку) водной суспензии свежих спор наносится на середину покровного стекла, которое в свою очередь накладывается каплей вниз на тонкий слой (1.5 мм) 1.5% агар-агара, нанесенного на предметное стекло. После этого производится микрофотографирование. При незначительном количестве спор суспензия сгущается путем центрифугирования на малых оборотах. При невозможности немедленного фотографирования препараты можно некоторое время (до трех недель) сохранять, обводя края покровного стекла расплавленным парафином. Отдавая должное тонко разработанной методике микрофотографирования, мы все же не можем считать этот метод основным при определении видовой принадлежности миксоспоридий. Прежде всего ни одна, даже самая лучшая микрофотография, не может за-

менить коллекционный материал. Между тем препараты, изготовленные для микрофотографирования, очень недолговечны. Далее споры миксоспоридий при своих очень мелких размерах обладают относительно большой толщиной: толщина или несколько меньше, или даже полностью соответствует ширине споры. В этом случае нет никакой возможности сфокусировать миксоспоридий так, чтобы одинаково хорошо и четко просматривались все детали строения споры. Фокусируя, например, вершину одной полярной капсулы, мы рискуем получить неясное изображение вершины другой или интеркаспуллярного отростка. Более того, слабо заметный интеркаспуллярный отросток может вообще выпасть из поля зрения. В связи с этим одинаковые споры одного и того же вида могут выглядеть на разных микрофотографиях по-разному. Таким образом, микрофотографии хотя и могут служить хорошим дополнительным методом для исследования миксоспоридий (особенно для изучения изменчивости спор или подсчета числа витков полярных нитей), однако они ни в какой мере не могут заменить ни коллекционный материал, ни грамотно выполненный рисунок. Следовательно, для правильного определения миксоспоридий необходимо составление коллекций постоянных препаратов, в которых, с одной стороны, споры наиболее приближались бы по размерам и форме к живым, с другой — имелась бы возможность четко различать все основные детали их строения. Этим и некоторым другим условиям больше всего отвечают глицерин-желатиновые препараты (7 г желатина на 42 см³ дистиллированной воды + + 50 г глицерина и 0,5 г кристаллической карболовой кислоты). Прежде всего чрезвычайно упрощается способ сбора и консервирования. Для приготовления препарата достаточно расплавить на предметном стекле кусочек глицерин-желатина, и в образовавшуюся каплю внести разорванную цисту или часть ее, тщательно размешать и покрыть покровным стеклом. В случае небольшого числа спор можно использовать нативный препарат. Для этого нужно расплавить кусочек глицерин-желатина на кончике глазного скальпеля, приподнять покровное стекло, внести под него расплавленную массу и, предварительно размешав ее, снова прикрыть тем же стеклом. Предварительной фиксации этот метод не требует. Как показал наш 20-летний опыт, глицерин-желатиновые препараты отличаются долговечностью. Чтобы избежать высыхания, достаточно окантовать покровное стекло канадским бальзамом, каретным лаком или другими специальными замазками (следует избегать применения для этой цели асфальтового лака).

Споры, заключенные в глицерин-желатине, вначале несколько сморщиваются, но через некоторое время полностью восстанавливают свою форму. При этом, как показали многочисленные проверки, зрелые споры не меняют или почти не меняют своих размеров. Несколько уменьшаются лишь незрелые споры, играющие меньшую роль при определении. Однако и у них изменение размеров сравнительно невелико, обычно не больше 5%. Существенным недостатком этого метода является сильное перепросветление спор в глицерин-желатине, вследствие чего детали их строения становятся значительно менее заметны, чем на живых объектах. Однако этот недостаток полностью устраняется применением метода фазового контраста. Более того, при фазовоконтрастном микроскопировании в большинстве случаев хорошо видна йодофильная вакуоль, для выявления которой обычно необходима специальная окраска (жидкость Люголя и пр.). Четко видны без специального окрашивания ядра, интеркаспуллярный отросток, скульптура створок, а в некоторых случаях даже крышки полярных капсул и спирально свернутые полярные нити. Пользуясь микровинтом, исследователь имеет большие возможности для выявления и правильного расположения в пространстве всех видимых в световой микроскоп деталей строения споры.

Все сказанное выше позволяет в настоящее время считать наиболее перспективной для определения миксоспоридий методику приготовления глицерин-желатиновых препаратов с последующим использованием фазового контраста микроскопии. Для уточнения некоторых деталей, особенно для изучения изменчивости спор и подсчета витков полярных нитей, можно дополнительно использовать методику, предложенную Ломом.

В последнее время мы пробовали использовать для приготовления препаратов из спор миксоспоридий пикрат аммония. В этом случае процесс приготовления препаратов еще более упрощается: достаточно нанести каплю этого реактива на объект и покрыть его покровным стеклом. В пикратаммониевых препаратах довольно четко видны полярные капсулы, интеркаспуллярный отросток и особенно хорошо скульптура створок и шовная линия. Однако мы еще не смогли проверить длительность сохранения этих препаратов, а также степень влияния пикрата аммония на размеры спор. До более тщательной проверки на массовом материале этот метод можно пока рекомендовать только как дополнительный, особенно при выявлении скульптуры створок.

Все перечисленные выше методики применимы лишь для изучения спор и совершенно недостаточны для исследования вегетативных форм. Для обработки плазмодиев по-прежнему наиболее эффективным методом остается фиксация влажных мазков жидкостью Шаудина с последующей окраской гематоксилином по Гейденгайну, Гимза-Романовскому и другими красителями, а для крупных цист фиксация нейтральным формалином или жидкостью Буэна с последующим приготовлением срезов и окраской теми же красителями. Однако эти исследования при определении видовой принадлежности миксоспоридий должны рассматриваться как дополнительные.

Л и т е р а т у р а

- А х м е р о в А. Х. и М а р т ъ я н о в а И. П. 1958. К методике определения сли-
зистых споровиков рода *Chloromyxum* Mingazini, 1890. Зоол. журн., 37 (4) : 619.
С éр è d e C. 1906. *Myxidium giardi* Cépède et la pretendue immunité des Anguilles
myxosporidiennes. C. R. Soc. Biol., 60 : 15—16.
K u d o R. 1919 (1920). Studies on Myxosporidia. A synopsis on genera and species of
Myxosporidia. Ill. Biol. Monogr., 5 (3—4) : 1—265.
K u d o R. 1921. On the effect of some fixatives upon Myxosporidian spores. Trans.
Amer. Microscop. Soc., 11 (4) : 161—167.
L o m J. 1969. On a new taxonomic character in Myxosporidia, as demonstrated in de-
scriptions of two new species of *Myxobolus*. Folia parasitologica, 16 : 97—183.
-

ON METHODS OF STUDIES OF MIXOSPORIDIANS (PROTOZOA, CNIDOSPORIDIA)

Z. S. Donetz and S. S. Shulman

S U M M A R Y

Architectonic of spores, their shape, size and some other details of the structure are used for determination of species belonging and taxonomic status of mixosporidians. Therefore, the preparation of glycerine-gelatine slides (without preliminary fixation) with subsequent employment of phase-contrast microscopy should be considered the most advantageous technique of fixation and treatment of mixosporidians for their determination. All other methods can be used as additional ones.
